

Sistema para Avaliação de Risco de Estressores Ambientais a Insetos Não Alvo

Foto: Débora Pires Paula



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 311

Sistema para Avaliação de Risco de Estressores Ambientais a Insetos Não Alvo

Débora Pires Paula
Lucas Machado de Souza
David Alan Andow
Alex Antônio Torres Cortês de Sousa
Carmen Silvia Soares Pires
Edison Ryoiti Sujii

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols
 Lúgia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosamires Rocha Galvão
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
 João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Normalização bibliográfica: Rosamires Rocha Galvão
Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sistema para avaliação de risco de estressores ambientais a insetos não alvo. / Débora Pires Paula... [et al.] – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 19 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 311).
1. Controle biológico – Insetos-praga. 2. *Cycloneda sanguinea*. 3. Teste ecotoxicológico. I. Paula, Débora Pires. II. Souza, Lucas Machado de. III. Andow, David Alan. IV. Sousa, Alex Antônio Torres Cortês de. V. Pires, Carmen Sílvia Soares. VI. Sujii, Edison Ryoiti. VII. Série.

632.95 – CDD 21

© Embrapa 2015

Sumário

Resumo.....	05
Abstract.....	07
Introdução.....	08
Material e Métodos.....	09
Resultados e Discussão.....	13
Conclusões.....	15
Referências Bibliográficas.....	16

Sistema para Avaliação de Risco de Estressores Ambientais a Insetos Não Alvo

Débora Pires Paula¹

Lucas Machado de Souza²

David Alan Andow³

Alex Antônio Torres Cortês de Sousa⁴

Carmen Silvia Soares Pires⁵

Edison Ryoiti Sujii⁶

Resumo

Novas tecnologias podem produzir estressores ambientais e seus impactos potenciais sobre organismos não alvo precisam ser avaliados como parte da análise de biossegurança durante o desenvolvimento. Este trabalho apresenta um sistema artificial de criação de pulgões para avaliação ecotoxicológica de potenciais estressores ambientais a insetos não alvo. O sistema consiste em um tubete de acrílico transparente (2,5 cm x 2,5 cm) onde em uma extremidade monta-se um sachê de parafilme contendo em seu interior uma dieta líquida, sob a qual os pulgões se alimentam. O predador *Cycloneda sanguinea* foi criado desde larva neonata até pupa alimentando-se de pulgões provenientes desse sistema. O sistema tritrófico artificial não afetou seu desenvolvimento e a sobrevivência de larvas e pupas. Portanto, o sistema tritrófico artificial pode ser utilizado como uma rota de exposição ecologicamente relevante para avaliação de risco de estressores ambientais, possibilitando avaliação *ex-ante* ao desenvolvimento de um produto tecnológico e melhor acurácia na

estimativa da resposta biológica.

Termos para indexação: *Cycloneda sanguinea*, testes ecotoxicológicos, rotas de exposição, *Myzus persicae*.

¹ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Biólogo, MSc, Analista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Biólogo, Ph.D., Bolsista de Pesquisador Visitante, Universidade de Brasília.

⁴ Engenheiro-agrônomo, MSc, Técnico, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁵ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁶ Engenheiro-agrônomo, Ph.D., Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Artificial System for Risk Assessment of Environmental Stressors on Non-Target Insects

Abstract

New technologies may produce environmental stressors and their potential impact on non-target organisms should be evaluated as part of the biosafety analysis during their development. This work presents a test of an artificial system for rearing aphids to use in ecotoxicological evaluation of potential environmental stressors on predator insects. The system consists of a hollow acrylic tube (2.5 cm x 2.5 cm) with one end covered by a sachet of Parafilm M containing liquid diet for aphids, which feed from the underside of the sachet. *Cycloneda sanguinea* was reared in this system from neonate larvae to pupae. Therefore the artificial tritrophic system can be used as a relevant ecological exposure route for risk assessment of environmental stressors, enabling an ex-ante evaluation early in the development of a technological product and improving the accuracy of the estimated biological response.

Index terms: *Cycloneda sanguinea*, ecotoxicological tests, exposure routes, *Myzus persicae*.

Introdução

Novas tecnologias podem produzir entidades físicas, químicas ou biológicas que podem causar uma resposta adversa no meio ambiente, sendo denominada de estressor ambiental (USA-EPA, 2013).

Um dos componentes-chave da avaliação de risco ambiental dos impactos potenciais de estressores ambientais é a análise da resposta biológica de organismos não alvo, os quais podem ser afetados não intencionalmente pelos estressores ambientais, incluindo herbívoros, decompositores, polinizadores e inimigos naturais (HILBECK et al., 2006; ROMEIS et al., 2008).

Este trabalho tem como foco organismos não alvo, neste caso insetos predadores, que foram selecionados devido ao seu importante serviço ecossistêmico de controle biológico de insetos-praga. Insetos predadores podem ser expostos aos estressores ambientais por meio de exposição direta ou indireta (GROOT; DICKE, 2002; ROMEIS et al., 2006; LÖVEI et al., 2009). A exposição direta (ou bitrófica) ocorre ao consumir partes da planta (base da cadeia alimentar, primeiro nível trófico) contendo o estressor ambiental. Isso se deve ao fato de muitos predadores serem onívoros e se alimentarem, em pelo um estágio do ciclo de vida, de partes de plantas – pólen, néctar, floema, etc. A exposição indireta (ou tritrófica) ocorre pela predação de presas (herbívoros, segundo nível trófico), que por sua vez se alimentam da planta contendo o estressor ambiental. As presas também podem ser afetadas pelo estressor ambiental, reduzindo sua qualidade ou quantidade disponível para o predador (DUTTON et al., 2002).

A avaliação ecotoxicológica sobre insetos não alvo frequentemente é realizada de duas formas: a) colocando-se o predador para se alimentar da planta (ou de partes desta, como o pólen) contendo o estressor ambiental ou a presa que teve contato com tal material vegetal; ou b) inoculando-se ou aspergindo-se o estressor ambiental, extraído da planta ou sintetizado, sobre dietas artificiais ou sobre o alimento do predador. No primeiro caso, a avaliação de risco ambiental fica limitada

pós-desenvolvimento do produto tecnológico; no segundo, ao baixo poder das inferências ecológicas que podem ser tomadas de tais rotas de exposição que não simulam adequadamente as condições biológicas em que serão expostos, especialmente para predadores

Neste trabalho, apresenta-se um sistema prático que pode ser utilizado para realizar análises ecotoxicológicas *ex-ante* de resposta a estressores ambientais em insetos benéficos não alvo por meio de uma exposição tritrófica ecologicamente relevante. Para isso, demonstra-se sua utilização para a criação de larvas da espécie de predador generalista comum nos agroecossistemas nacionais, o besouro *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae).

Material e Métodos

Obtenção dos insetos

Os pulgões verdes, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), foram obtidos de colônia de criação em casa de vegetação e do campo. Em casa de vegetação, a criação foi realizada em plantas de couve, variedade manteiga portuguesa, *Brassica oleraceae* var. *acephala* (Brassicaceae), cultivadas em vasos com volume de 0,25 dm³ de solo, mantida a 25 ± 2°C, 60 ± 10% U.R. e iluminação natural. Utilizou-se latossolo vermelho com pH corrigido e realizou-se adubação com macro e micronutrientes. A irrigação foi realizada a cada dois dias, com lâmina de 100 mL por vaso. Em campo, os pulgões foram obtidos de folhas de couve coletadas de fazendas de produção de base ecológica. Para preservar os pulgões por mais tempo, as folhas de couve trazidas do campo foram acondicionadas em potes plásticos de 3 litros e estocadas em geladeira a 5°C por até uma semana.

O predador *C. sanguinea* foi obtido por coleta manual na fase adulta em plantio comercial orgânico ou no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os adultos foram mantidos em

gaiolas plásticas de 3 litros em densidade variada (< 20 indivíduos por pote) e sem controle da razão sexual. Diariamente foram supridos pulgões de espécies variadas coletadas no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ou das fazendas. A criação foi realizada em câmaras climatizadas (B.O.D.) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 16 h, sem controle e registro da umidade relativa do ar. Diariamente foi monitorada a presença de massas de ovos, os quais foram transferidos para potes plásticos de 250 mL para aguardar emergência das larvas. As larvas recém-emergidas (< 24 h) não alimentadas foram utilizadas para os testes de alimentação via sistema tritrófico artificial.

Preparação do sistema artificial

O sistema artificial consiste de tubetes cilíndricos de acrílico transparente, com diâmetro e altura de 2,5 cm x 2,5 cm, contendo em uma extremidade um sachê feito com duas camadas de parafilme M preenchida no interior com 150 a 500 μL de dieta líquida artificial para pulgão, e a outra extremidade aberta (DOUGLAS; VAN EMDEN, 2007). Para cada tubete, deve-se ter dois pedaços quadrados de parafilme M com tamanho um pouco maior do que o diâmetro do tubete. Um pedaço de parafilme M deve ser esticado nas quatro laterais e prendido em uma extremidade do tubete (Figura 1). Faz-se então a esterilização dos tubetes contendo uma camada de parafilme M e dos pedaços avulsos de parafilme pela irradiação com luz ultravioleta (UV) por 30 a 40 minutos em câmara de fluxo laminar limpa previamente com etanol 70%.

A dieta líquida utilizada foi a proposta por Dadd e Mittler (1966), a qual serve para várias espécies de pulgões. A dieta foi esterilizada dentro de uma câmara de fluxo laminar, por filtração em filtro de tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ acoplado a uma seringa plástica. A dieta esterilizada foi armazenada em tubos plásticos estéreis, e os tubos foram abertos apenas em câmara de fluxo laminar operante. Preferencialmente, a

dieta filtrada deve ser armazenada em alíquotas menores (por exemplo, em tubos de 15 mL) e congelada para uso em até 6 meses.

A montagem completa do sistema deve ser feita em câmara de fluxo laminar, logo após ter irradiado os tubetes e parafilmes com luz UV. Deve-se utilizar ponteira estéril para pipetar a dieta estéril sobre os tubetes de acrílico contendo uma camada de parafilme M esterilizado. Fecha-se então o sachê de parafilme M colocando o lado irradiado com UV do segundo pedaço de parafilme em contato com a dieta, esticando-o nas quatro laterais para cobrir completamente a primeira camada de parafilme com dieta e prender nas laterais do tubete. Os tubetes prontos (Figura 1A) podem ser armazenados em *freezer*, dentro de potes plásticos para prevenir ressecamento, por até 6 meses.

Com os tubetes prontos, os pulgões podem ser transferidos para dentro do sistema com auxílio de pincel (pelo natural nº 02), em quantidade a depender da quantidade de dieta que foi adicionada (Figura 1B). Por exemplo, o tubete contendo 500 μ L de dieta pode comportar até 100 pulgões. Na ausência de predadores, os pulgões irão se reproduzir a uma taxa que dependerá da densidade. Recomenda-se transferir os pulgões para novos sistemas a cada dois dias, a fim de evitar crescimento de microrganismos contaminantes. A transferência faz-se sem necessidade de manipular os pulgões, encaixando-se a extremidade livre de um tubete novo com a do tubete antigo e prendendo-os com parafilme. Faz-se então um furo no parafilme da dieta do tubete antigo, que deve ficar de cabeça para baixo a fim de drenar a dieta sobre papel absorvente. Com a drenagem, os pulgões naturalmente se movem para o tubete contendo a dieta nova, na parte superior, podendo-se então desacoplar os tubetes.

Criação de imaturos de coccinelídeo no sistema tritrófico artificial

Larvas neonatas (< 24 h) não alimentadas de *C. sanguinea* foram

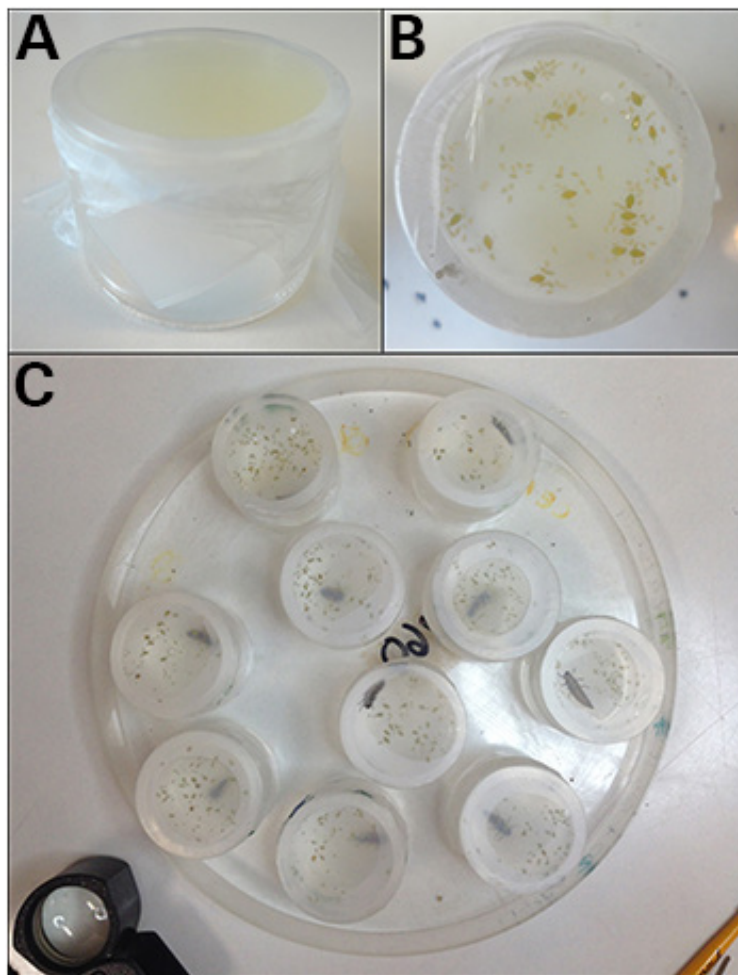


Figura 1. Sistema artificial para criação de pulgões e predadores: A) Componentes do sistema (1 tubete, um sachê formado por duas camadas de parafilme); B) Sistema contendo pulgões da espécie *M. persicae* se alimentando no interior do sistema, sob a camada inferior do sachê; C) Sistema contendo larvas de *C. sanguinea* se alimentando dos pulgões.

transferidas individualmente para tubetes contendo pulgões *M. persicae* que se alimentavam de dieta artificial (Figura 1C). Ao todo, 50 pulgões foram oferecidos por dia, mas a quantidade deve ser otimizada de

acordo com a espécie do predador. A criação ocorreu dentro de câmaras climatizadas (B.O.D) sob temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 16 h de fotofase. Cada tubete contendo uma larva foi considerado uma unidade experimental, havendo no mínimo 10 repetições. Água foi suprida diariamente por meio de um pedaço de papel filtro umedecido. Diariamente as larvas foram transferidas para novos tubetes contendo pulgões, e fez-se o monitoramento do tempo de desenvolvimento e sobrevivência larval e pupal. Os adultos recém-emergidos (< 24 h) foram individualmente pesados e sexados por meio do formato do quinto esternito abdominal.

Resultados e Discussão

O tempo de desenvolvimento das larvas de *C. sanguinea* foi $9,33 \pm 0,12$ (EP) dias ($n = 56$), e o peso das pupas $13,38 \pm 0,56$ mg (EP) ($n = 55$), similar ao reportado em outros trabalhos sobre criação deste predador em sistema tritrófico natural alimentando-se pulgões em plantas (SANTA-CECÍLIA et al., 2001; ISIKBER; COPLAND, 2002; FUNICELLO, 2010; SOUZA et al., 2013), embora a sobrevivência de $73,42 \pm 4,97$ % (EP) ($n = 72$) tenha sido menor do que a reportada por Funicello (2010) e Souza et al. (2013).

De maneira geral, a criação do predador em sistema tritrófico artificial ofereceu condições adequadas para o desenvolvimento da espécie. As principais vantagens da utilização do sistema tritrófico artificial são: a) a independência de planta hospedeira da presa, possibilitando que a avaliação de estressores ambientais seja feita no início do desenvolvimento de uma tecnologia (por exemplo, plantas GM); b) o controle da exposição ao estressor ambiental, tanto em termos de quantidade (concentração) quanto em seu nível constante e homogêneo para as presas. No primeiro caso, a antecipação de testes ecotoxicológicos feitos com rota de exposição ecologicamente relevante pode fornecer embasamento experimental para otimizar a tecnologia desejada (por exemplo, tornar uma entomotoxina mais

espécie-específica) ou mesmo fornece subsídios para a tomada de decisão de investir ou não na tecnologia. No segundo caso, o controle da quantidade, homogeneidade e frequência de exposição a um estressor ambiental é de fundamental relevância na análise de risco, já que proporciona maior acurácia na estimativa da variabilidade dentro e entre tratamentos, pois possibilita a redução do erro residual.

As seguintes dificuldades devem ser consideradas quanto ao uso do sistema: a) os tubetes de acrílico são feitos sob encomenda, no Brasil ou no exterior; b) a troca periódica dos tubetes com dieta fresca, de preferência a cada dois dias; e c) a preparação periódica, embora não frequente, de mais tubetes com dieta. Os dois últimos itens são de certa forma relativos a qualquer outro método de criação de insetos, pois sempre haverá atividades de manutenção periódica.

O sistema tritrófico artificial também pode ser testado para avaliação de risco de outros predadores generalistas comuns em certas culturas, tais como *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Doru luteipes* (Dermaptera: Forficulidae), *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae), sirfídeos, de outros insetos benéficos, tais como parasitoides de pulgões, ou mesmo de pulgões (PAULA; ANDOW, 2015). A versatilidade do sistema facilita ainda a avaliação de risco não apenas no segundo e terceiro níveis tróficos da cadeia alimentar, mas consequentemente também no quarto nível trófico (como parasitoides dos predadores ou hiperparasitoides) e a outros tipos de interações tróficas (como canibalismo e predação intraguildd). Adicionalmente, diversos tipos de estressores ambientais podem ser testados adicionando-os diretamente na dieta dos pulgões, tais como proteínas Bt (PAULA et al., 2015), dsRNAi e agentes entomopatogênicos (por exemplo, bactérias).

Conclusões

O sistema tritrófico artificial apresentado neste trabalho é uma rota de exposição prática e ecologicamente relevante para ser utilizado em avaliação de risco de estressores ambientais a insetos não alvo. O sistema garante exposição constante e homogênea que confere maior acurácia na estimativa da resposta biológica e pode ser utilizado para avaliação *ex-ante* ao desenvolvimento de um produto tecnológico.

Agradecimentos

À Bruna Lima pelo auxílio na preparação das dietas, na montagem do sistema artificial e nas coletas dos pulgões em campo; ao agricultor Juã Pereira por permitir a coleta de *M. persicae* em sua propriedade.

Referências Bibliográficas

CARVALHO, C. F.; SOUZA, B. Métodos de criação e produção de crisopídeos. In: BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas, produção massal e controle de qualidade**. Lavras, MG: UFLA, 2009. p. 77-115.

DADD, R. H.; MITTER, T. E. Permanent culture of an aphid on a totally synthetic diet. **Experientia**, v. 22, p. 832-833, 1996.

DOUGLAS, A. E.; VAN EMDEN, H. F. Nutrition and symbiosis. In: VAN EMDEN, H. F.; HARRINGTON, R. **Aphis as crop pests**. Wallingford: CABI International, 2007. p. 115-134.

DUTTON, A.; KLEIN, H.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. **Ecological Entomology**, v. 27, p. 441-447, 2002.

FUNICHELLO, M. **Aspectos biológicos de Cycloneda sanguinea (L.) (Coleoptera: Coccinellidae) e de Aphis gossypii glover (Hemiptera: Aphididae), criados nas cultivares Deltaopal e Nuopal (Bollgard i)**. 2010. 56 p. Dissertação (mestrado) - UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

GROOT, A. T.; DICKE, M. Insect-resistant transgenic plants in a multi-

trophic context. **Plant Journal**, v. 31, p. 387-406, 2002.

HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; ARPAIA, S.; BIRCH, A. N. E.; FONTES, E. M. G.; LÖVEI, G. L.; SUJII, E. R.; WHEATLEY, R. E.; UNDERWOOD, E. Methodology to support non-target and biodiversity risk assessment. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G.; KAPUSCINSKI, A. R.; SCHEI, P. J. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Wallingford: CABI Publishing, 2006. v. 2, p. 108-132.

IŞIKBER, A. A.; COPLAND, M. J. W. Effects of various aphid foods on *Cycloneda sanguinea*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 102, p. 93–97, 2002.

LÖVEI, G. L.; ANDOW, D. A.; ARPAIA, S. Transgenic insecticidal crops and natural enemies: a detailed review of laboratory studies. **Environmental Entomology**, v. 38, p. 293-306, 2009.

PAULA, D. P.; ANDOW, D. P. **Differential Cry toxin detection and effect on *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphidinae) feeding on artificial diet**. 2016. No prelo na revista Entomologia Experimentalis et Applicata.

PAULA, D. P.; ANDOW, D. A.; BELLINATI, A.; TIMBÓ, R. V.; SOUZA, L. M.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R. **Limitations in dose-response and surrogate species methodologies for risk assessment of Cry toxins on arthropod natural enemies**. 2016. No prelo na revista Ecotoxicology.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 63-71, 2006.

ROMEIS, J.; BARSCH, D.; BIGLER, F.; CANDOLFI, M. P.; GIELKENS, M. M. C.; HARTLEY, S. E.; HELLMICH, R. I.; HUESING, J. E.; JEPSON, P. C.; LAYTON, R.; QUEMADA, H.; RAYBOULD, A.; ROSE,

R. I.; SCHIEMANN, J.; SEARS, M. K.; SHELTON, A. M.; SWEET, J.; VAITUZIS, Z.; WOLT, J. D. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to non-target arthropods. **Nature Biotechnology**, v. 26, 203-208, 2008.

SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R.; TÔRRES, R. M. S.; NASCIMENTO, F. B. Aspectos biológicos e consumo alimentar de larvas de *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Coccinellidae) alimentadas com *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1273-1278, 2001.

SOUZA, L. M.; BELLINATI, A. B.; PAGANELLA, M. B.; PAULA, D. P.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R. **Desenvolvimento de dieta artificial para *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2013. 18 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 294).

SUTER, G. W. (Ed.). **Ecological risk assessment**. 2. ed. Boca Raton: CRC, 2007. 680 p.

WRIGHT, J. P.; FISHER, D. B.; MITTLER, T. E. Measurement of aphid feeding rates on artificial diets using ³H-inulin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 37, p. 9-11, 1985.



Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA